

機関番号：82603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790453

研究課題名（和文）腸管粘膜における HIV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞の誘導機構に関する研究

研究課題名（英文）Study for the mechanism of HIV-1-specific CTL induction in the intestinal mucosa

研究代表者

寺原 和孝 (TERAHARA KAZUTAKA)

国立感染症研究所・免疫部・研究員

研究者番号：50469954

研究成果の概要（和文）：本研究では、腸管粘膜におけるヒト免疫不全ウイルス（HIV）特異的細胞傷害性 T 細胞（CTL）の誘導機構を明らかにすることを目的とした。パイエル板への到達性に違いのあるサルモネラ菌変異株を担体として HIV-1 Gag 抗原をマウスに経口投与した結果、パイエル板への到達性の有無に関わらず、全身系ならびに腸管粘膜における抗原特異的 CTL の誘導はほとんど認められなかった。明確な結果を得るためには、今後も更なる条件検討が必要とされる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the mechanism by which human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) are induced in the intestine. HIV-1 Gag-expressing *Salmonella typhimurium aroA*⁻ or *aroA invA*⁻ mutants, which can or not, respectively, penetrate Peyer's patches, were used as oral antigens into mice. However, Gag-specific CTLs were hardly induced in both the systemic and the gut mucosal compartments. Further study should be needed for better understanding of the role of Peyer's patches in the induction of mucosal CTLs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,600,000	0	1,600,000
平成 22 年度	1,700,000	0	1,700,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：感染防御・ワクチン

1. 研究開始当初の背景

腸管粘膜におけるヒト免疫不全ウイルス（HIV）特異的な免疫応答、特に細胞傷害性 T 細胞（CTL）の誘導は、HIV 感染防御やエイズ病態進行の阻止に非常に有効であると考えられており、これを可能にする新たな視点からの予防・治療エイズワクチンの開発が望まれる。パイエル板は腸管粘膜における主要な IgA 抗体誘導組織として知られているが、

CTL 誘導への関与については不明である。

2. 研究の目的

本研究では、パイエル板への到達性に違いのあるサルモネラ菌変異株を担体として HIV-1 Gag 抗原をマウスに経口投与し、腸管粘膜における HIV 特異的 CTL の誘導について、パイエル板の役割を明らかにすることを目的とした。また、免疫不全マウスにヒト造

血幹細胞を移植して得られたヒト化マウスの適用についても併せて検討した。

3. 研究の方法

(1) マウス小腸上皮層における M 細胞の分布の解析

BALB/c マウス小腸上皮層において、M 細胞に特異的に反応性を示す NKM 16-2-4 モノクローナル抗体、レクチン UEA-1 あるいは M 細胞非反応性のレクチン WGA を用いて M 細胞の分布をフローサイトメトリー、共焦点レーザー顕微鏡により解析した。その際、ナイーブマウスの他、腸内環境を変動させる目的で cholera toxin (CT)、dextran sodium sulfate (DSS)、あるいはインドメタシンを投与したマウスについても解析した。M 細胞の機能的評価として、腸管結紮法により投与した GFP 発現 *Salmonella typhimurium* PhoPc の取り込み能をフローサイトメトリーおよびコロニー形成試験により解析した。

(2) 小腸上皮層におけるフコース発現機構の解析

M 細胞を含めたフコース発現細胞 (NKM 16-2-4⁺/UEA-1⁺細胞) をセルソーター付きフローサイトメーターにより分取し、フコース転移酵素である Fut1 および Fut2 の mRNA の定量的発現を real-time RT-PCR により解析した。また、Fut1 KO マウスおよび Fut2 KO マウスの小腸上皮層における NKM 16-2-4、UEA-1、WGA の反応性について、ホールマウント染色試料を用いた組織学的解析を共焦点レーザー顕微鏡下にて行った。

(3) Gag 発現サルモネラ菌の経口投与による免疫応答の解析

2 種類の弱毒 *S. typhimurium* 株 (*aroA*⁻, *aroA-invA*⁻) について HIV-1 Gag-EGFP あるいは EGFP のみを発現するプラスミドでトランスフォームし、合計 4 種類の菌株を調製した (Gag 発現 *aroA*⁻株: AT-Gag, EGFP 発現 *aroA*⁻株: AT-EGFP, Gag 発現 *aroA*⁻ *invA*⁻株: ATK-Gag, EGFP 発現 *aroA*⁻ *invA*⁻株: ATK-EGFP)。

BALB/c マウスに対し、これら 4 種類の菌株 (10⁹ CFU) を 2 週の間隔で合計 4 回経口免疫した。コントロールとして PBS を経口投与した。経口免疫 2 回目以降の各回免疫直前に糞便および末梢血を採取した。最終免疫から 1 週後に解剖し、糞便、末梢血、脾臓、パイエル板、小腸絨毛部、腸間膜リンパ節を採取した。液性免疫の解析は、糞便および末梢血におけるサルモネラ菌あるいは Gag p24 に対する抗原特異的 IgA、IgG のタイターを ELISA により解析した。細胞性免疫の解析は Gag 特異的 IFN- γ 発現細胞の頻度を ELISPOT にて解析した。すなわち、脾臓、

パイエル板、小腸絨毛粘膜固有層、腸間膜リンパ節から調製した単核球を Gag197 ペプチド存在下で A20.2J 細胞と共培養し、それにより誘導される IFN- γ 産生細胞を計数した。

(4) ヒト化マウスの構築ならびにヒト免疫細胞分化の解析

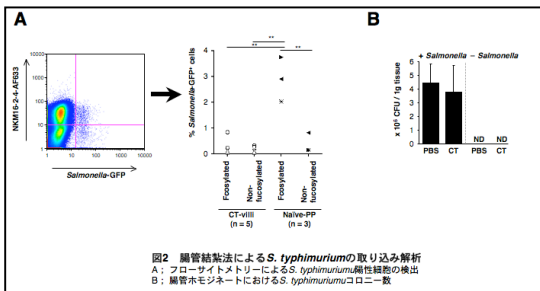
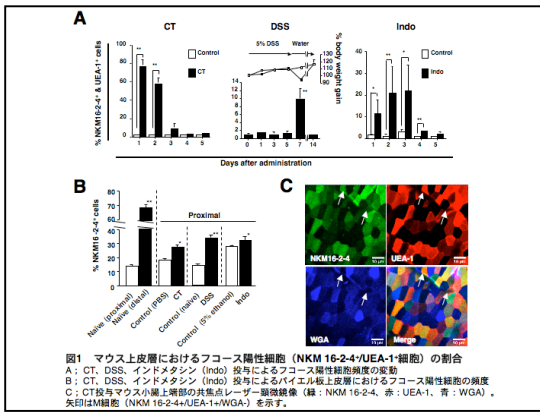
生後 2 日以内の重度免疫不全マウス (NOD/SCID/Jak3 KO: NOJ マウス) の肝臓に、ヒト臍帯血から MACS にて調製した CD133⁺造血幹細胞 (5-10 \times 10⁴細胞) を移植した。移植後 8 週目から経時的に末梢血を採取し、蛍光標識抗ヒト CD3、CD4、CD8、CD14、CD19、CD45、抗マウス CD45 抗体で染色してフローサイトメトリーにて解析した。末梢血で十分なヒト免疫細胞の分化が認められた個体を解剖し、脾臓、骨髄、小腸、腸間膜リンパ節を採取した。各組織から単核球を調製し、上記抗体の他、抗ヒト CD11c、CD56、CD68、CD123 も用いて染色を行い、フローサイトメトリーにて解析した。

4. 研究成果

(1) マウス小腸上皮層における M 細胞の分布様式

S. typhimurium の侵入門戸として知られている M 細胞の分布について、M 細胞マーカーであるフコースの発現を NKM 16-2-4 および UEA-1 の反応性を指標に解析を行った。その結果、ナイーブマウスでは小腸下端 (おもに回腸) のパイエル板ならびに絨毛上皮層にフコース陽性 (NKM 16-2-4⁺/UEA-1⁺) 細胞が高頻度に存在したが、小腸上端 (十二指腸から空腸) 絨毛上皮層ではフコース陽性細胞がほとんど存在しなかった。興味深いことに、腸内環境を変動させた CT、DSS、インドメタシン投与マウスではいずれも、小腸上端 (十二指腸から空腸) の絨毛上皮層 (図 1A) およびパイエル板 (図 1B) とともにフコース陽性細胞が顕著に誘導された。しかしながら、WGA の反応性を解析した結果、これら誘導されたフコース陽性細胞は M 細胞と異なり、WGA 陽性を示した (図 1C)。

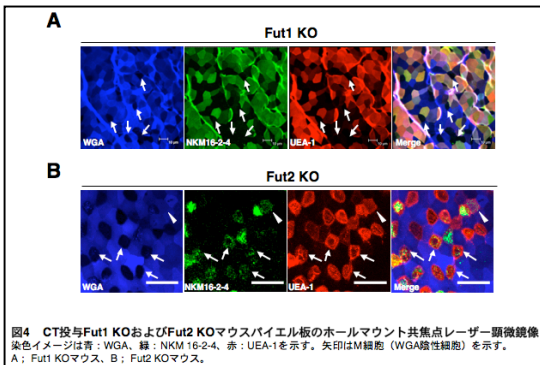
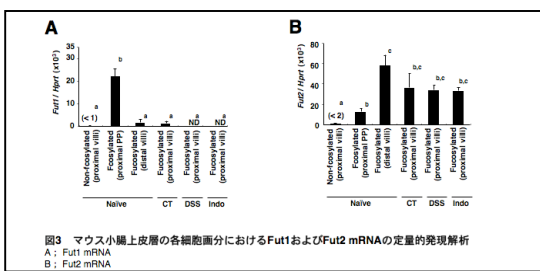
また、CT により誘導されたフコース陽性細胞による *S. typhimurium* の取り込み能を解析した結果、上皮細胞と同様に取り込み能を有していなかった。(図 2)。以上の結果から、誘導型フコース陽性細胞は M 細胞と区別すべき細胞集団であり、腸内環境変動下においても上皮細胞と同様にバリア機能を有し *S. typhimurium* の侵入門戸とならないことが示唆された。



(2) M 細胞および誘導型フコース陽性細胞におけるフコース発現調節機構

ナイーブあるいは CT, DSS, インドメタシン投与マウスの小腸上皮層からセルソーターにより分取した各細胞画分について、Fut1 および Fut2 mRNA の定量的発現解析を real-time RT PCR で行った結果、パイエル板 M 細胞画分のみ Fut1 mRNA の発現が認められた (図 3A)。一方、Fut2 mRNA の発現はパイエル板 M 細胞画分でも認められたものの、誘導型フコース陽性細胞画分において高い発現が認められた (図 3B)。

さらに Fut1 KO および Fut2 KO マウスを用いた組織学的解析から、パイエル板 M 細胞

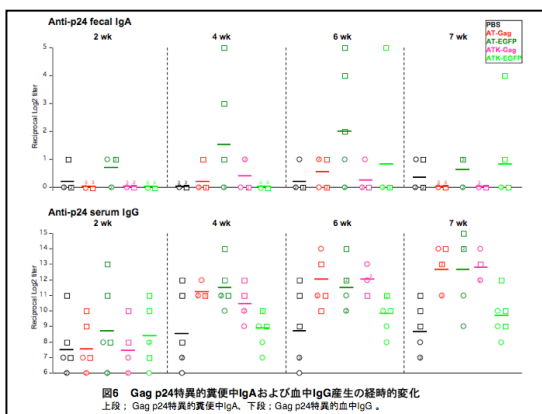
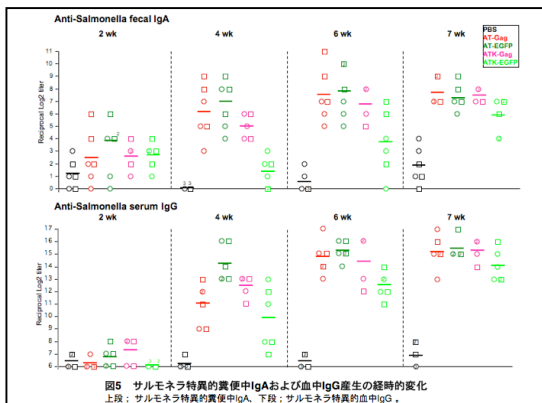


におけるフコースの発現は Fut1 依存的事であること (図 4A)、誘導型フコース陽性細胞においては Fut2 依存的事であること (図 4B) が示された。すなわち、Fut1 および Fut2 はそれぞれ M 細胞と誘導型フコース細胞を明確に区別する新たなマーカーとなり得ることが明らかとなった。

(3) Gag 発現サルモネラの経口投与による免疫応答

① 液性免疫応答

作出した Gag 発現パイエル板到達株 (AT-Gag) および Gag 発現パイエル板非到達株 (ATK-Gag) はともに ELISA の解析から、 1×10^9 CFU あたり $180 \mu\text{g}$ の Gag (Gag p24 換算) を発現することを確認した。これら菌株およびコントロール菌株 (AT-EGFP、ATK-EGFP)、または PBS を投与して糞便中の IgA および血中 IgG の産生を経時的に ELISA で解析した。その結果、サルモネラ特異的 IgA は (図 5)、経口免疫 3 回目 (6 wk) までは AT-Gag・AT-EGFP 投与群ともに高いタイターを示し、ATK-EGFP 投与群では低かった。しかしながら、ATK-Gag 投与群では AT-Gag・AT-EGFP 投与群と同程度の高いタイターを示した。そして、経口免疫 4 回目 (7 wk) では ATK-EGFP 投与群でも他の菌株と同様に高いタイターを示した。サルモネラ特異的 IgG についても同様な挙動を示した。一方、Gag p24 特異的抗体産生について (図 6)、IgA はどの投与群においてもほ



とんど誘導されなかったのに対し、IgG は経口免疫 2 回目 (4 wk) 以降で AT-Gag・ATK-Gag 投与群で誘導が認められた。しかし、AT-EGFP 投与群においても同程度のタイターが認められた。ATK-EGFP 投与群においては PBS 投与群と同様にほとんど認められなかった。

② 細胞性免疫応答

ELISPOT による結果、いずれの投与群においても Gag 特異的 IFN- γ 産生細胞はほとんど検出されなかった。

以上の液性免疫および細胞性免疫の解析結果から、サルモネラを担体とした経口免疫法ではサルモネラに対する液性免疫は誘導されるものの、Gag に対する液性・細胞性免疫誘導効果は非常に低かった。したがって、少なくとも AT-Gag 投与群において Gag 特異的細胞性免疫応答が誘導されるような実験条件の検討が必要である。

(4) ヒト化マウスにおけるヒト免疫細胞の分化

造血幹細胞移植を行い、末梢血サンプルの経時的な解析によりヒト CD45⁺白血球の分化が認められたヒト化マウスについて、末梢血、脾臓、骨髄、腸間膜リンパ節、小腸粘膜固有層における各種ヒト免疫細胞の分化をフローサイトメトリーにて解析した (図 7)。その結果、いずれの生体由来画分においても CD19⁺ B 細胞、CD3⁺ T 細胞の分化が認められた。一方、単球、樹状細胞、マクロファージなどの骨髄系白血球の分化レベルは非常に低く、骨髄や小腸粘膜固有層以外の生体由来画分ではほとんど観察されなかった。CD56⁺ NK 細胞は全ての生体由来画分で観察されなかった。

また、本解析において十分なヒト免疫細胞の分化が認められたヒト化マウスの小腸を精査した結果、パイエル板の形成は認められなかった。すなわち、パイエル板への到達性の異なるサルモネラ菌を担体とした免疫応答の解析は、ヒト化マウスでは適用できないことが明らかとなった。

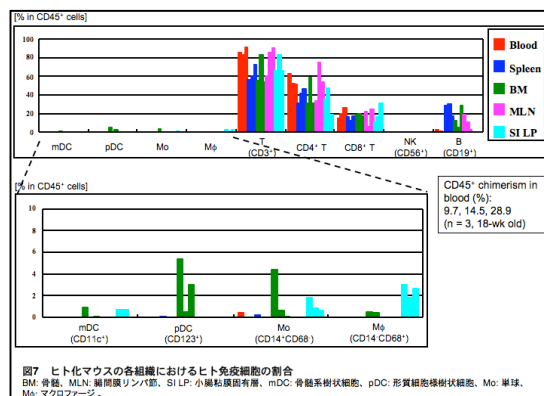


図7 ヒト化マウスの各組織におけるヒト免疫細胞の割合
BM: 骨髄、MLN: 腸間膜リンパ節、SI LP: 小腸粘膜固有層、mDC: 骨髄系樹状細胞、pDC: 形質細胞様樹状細胞、Mo: 単球、Mφ: マクロファージ。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- (1) Terahara K, Nochi T, Yoshida M, Takahashi Y, Goto Y, Hatai H, Kurokawa S, Jang MH, Kweon M-N, Domino SE, Hiroi T, Yuki Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Kobayashi K, Kiyono H. Distinct fucosylation of M cells and epithelial cells by Fut1 and Fut2, respectively, in response to intestinal environmental stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404: 822-828, 2011.

[学会発表] (計 11 件)

- (1) Mitsuki Y, Shibusawa K, Terahara K, Kobayashi K, Takeda M, Yanagi Y, Tsunetsugu-Yokota Y. HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. *Keystone Symposia, British Columbia, Canada, May 20-25, 2011.*
- (2) Shibusawa K, Mitsuki Y, Terahara K, Ishige M, Yanagi Y, Kobayashi K, Tsunetsugu-Yokota Y. Inhibition of HIV-1 replication by short hairpin RNA is augmented by using lentivirus vector pseudotyped with envelope proteins of wild-type measles virus. *Keystone Symposia, British Columbia, Canada, May 20-25, 2011.*
- (3) 渋沢謙太郎, 光木裕也, 寺原和孝, 石毛真行, 柳雄介, 小林和夫, 横田 (恒次) 恭子. 麻疹ウイルスエンベロープをもちいた HIV-1 増殖抑制性レンチウイルスベクターの開発とその有効性. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 7-9 日.
- (4) 石毛真行, 寺原和孝, 光木裕也, 渋沢謙太郎, 小林和夫, 岡田誠治, 横田 (恒次) 恭子. HIV-1 感染モデルとしてのヒト化マウスの妥当性と X4 および R5 HIV-1 感染. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 7-9 日.
- (5) Shibusawa K, Mitsuki Y, Terahara K, Ishige M, Yanagi Y, Kobayashi K, Tsunetsugu-Yokota Y. Inhibition of HIV-1 replication by envelope-engineered lentivirus vectors: efficient gene delivery using envelope protein of measles virus. *The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, Sep 7-10, 2010.*
- (6) Shibusawa K, Mitsuki Y, Terahara K, Yanagi Y, Kobayashi K, Tsunetsugu-Yokota Y. Inhibition of HIV-1 replication by engineered lentivirus vectors: a potential advantage of SLAM-mediated virus entry. *14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, Aug*

22-27, 2010.

- (7) Mitsuki Y, Shibusawa K, Terahara K, Kobayashi K, Takeda M, Yanagi Y, Tsunetsugu-Yokota Y. HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, Aug 22-27, 2010.
- (8) Terahara K, Ishige M, Mitsuki Y, Shibusawa K, Watanabe S, Okada S, Kobayashi K, Tsunetsugu-Yokota Y. Characteristic activation/differentiation phenotype of CD4⁺ T cells and their distinct susceptibility to X4-type and/or R5-type HIV-1 infection in humanized NOD/SCID/Jac3-null mice. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, Aug 22-27, 2010.
- (9) Tsunetsugu-Yokota Y, Terahara K. Factors crucial for the preferential propagation of R5-tropic HIV-1 in the early phase of HIV-1 infection. The 5th German-Japanese Symposium, Tokyo, Japan, May 9-12, 2010.
- (10) Mitsuki Y, Shibusawa K, Terahara K, Kobayashi K, Takeda M, Yanagi Y, Tsunetsugu-Yokota Y. HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. The 5th German-Japanese Symposium, Tokyo, Japan, May 9-12, 2010.
- (11) Shibusawa K, Mitsuki Y, Terahara K, Yanagi Y, Kobayashi K, Tsunetsugu-Yokota Y. Inhibition of HIV-1 replication by engineered lentivirus vectors: a potential advantage of SLAM-mediated virus entry. The 5th German-Japanese Symposium, Tokyo, Japan, May 9-12, 2010.

[その他]
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺原 和孝 (TERAHARA KAZUTAKA)
国立感染症研究所・免疫部・研究員
研究者番号：50469954

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし